

**AMYLASE
АМИЛАЗА
КИНЕТИЧЕН МЕТОД****ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА АМИЛАЗНА АКТИВНОСТ В СЕРУМ И УРИНА****ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

amylase

PNPG7 → PNPG3 + Maltotetraose

glucoamylase

PNPG3 → PNPG1 + Glucose

glucosidase

PNPG1 → p-Nitrophenol + Glucose

Скоростта на нарастване на абсорбцията измерена при 405nm е пропорционална на амилазната активност в пробата.

КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ

Определянето на амилазната активност в серум и урина най-често се прилага за диагностициране на остър панкреатит. При острия панкреатит амилазните нива са повишени за по-дълги периоди от време в урината, отколкото в серума. Следователно определянето на съотношението на изчистването на амилазата и креатинина е важно за проследяване развитието на панкреатита.

РЕАГЕНТИ

След приготвяне реагентът съдържа:

p-Nitrophenyl D-maltoheptaoside	0.9 mM
Glucosidase	25 000 IU/L
Glucoamylase	10 000 IU/L
Sodium Chloride	50 mM
Calcium Chloride	5mM
Buffer	50 mM

(pH 6.9 ± 0.1)

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Реагентите са само за "ин витро" употреба. Трябва да се спазват обичайните предпазни мерки за работа с лабораторни реагенти и да се избягва пипетиране с уста.

ПОДГОТОВКА НА РЕАГЕНТИТЕ

Разтворите съдържанието на всяка бутилка в количеството дейонизирана вода посочено на етикета на бутилката. Избягвайте пипетиране с уста, за да се избегне замърсяване на реагента с амилаза от слюнката. След добавянето на водата затворете съда и незабавно разбъркайте като обърнете няколко пъти съда нагоре-надолу. НЕ РАЗКЛАЩАЙТЕ.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

Сухият реагент е стабилен до изтичане на срока на годност, посочен на опаковката при съхранение при 2-8°C. Разтвореният реагент е стабилен поне 10 дни при стайна температура (18-25°C) и поне 30 дни в хладилник (2-8°C).

Реагентът трябва да бъде изхвърлен ако абсорбцията на разтворения реагент е 0.70 или по-висока, когато е измерена при 405 nm спрямо вода. Реагентът трябва да бъде изхвърлен ако в сухия реагент има образувани бучки, които могат да се дължат на евентуално проникване на влага; ако сухият реагент не се разтвори напълно или ако разтворът има признаци на помътняване.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

1. Серумът трябва да бъде отделен незабавно и този нехемолизиран серум е идеалния материал за пробата. Може да се използва и плазма от хепаринови епруветки.
2. Другите антикоагуланти като цитрат и EDTA се свързват с калция, йон необходим за амилазната активност. Следователно не трябва да се използва плазма с антикоагуланти различни от хепарин.
3. Уринните проби трябва да се събират за период от 24 часа, да се приравнят към pH 7.0 или с 0.1N NaOH или с 0.1N HCl и да се съхраняват в хладилник до извършването на теста. Към уринните проби няма нужда да се добавят консерванти.
4. Амилазата в серума и урината е стабилна (според литературата) една седмица при стайна температура (18-25°C) и няколко месеца, ако се съхранява в хладилник (2-8°C) и е защитена от изпаряване и бактериално замърсяване.

ИНТЕРФЕРИРАЩИ СУБСТАНЦИИ

Макроамилаземията повишава активността на панкреатитната амилаза в серума. Голям брой болести също могат да повлияят на точното изследване на амилазата. Медикаментите, които могат да имат интерфериращо въздействие са посочени в литературата. Липеми и хемолиза повишават стойностите на амилазата. Инсулинът и някои бактерии също повишават амилазната активност.

ПРОЦЕДУРА ЗА МАНУАЛНА РАБОТА

1. Разтворете реагента според указанията.
2. Пипетирайте 1.0ml от реагента в епруветките означени "контрола" "пациент" и т.н.
3. Темперирайте всички епруветки при 37°C в продължение на 3 минути.
4. Нулирайте спектрофотометъра с вода при 405 nm. Добавете 0.025ml (25µl) от пробата и отчетете след 15 секунди.
5. Продължете да отчитате на всеки 30 секунди в продължение на 2 минути.
6. Определете средната разлика в абсорбция на минута (ΔAbs/min).
7. Умножете (ΔAbs/min) по 4824, за да получите резултатите в IU/L.

КАЛИБРАЦИЯ

Процедурата трябва да бъде стандартизирана посредством милимолярната абсорбтивност на нитрофенола, която е 8.5 при 405 nm при условията на теста, описани за всяка нова партида.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Реагентът е линеен до 1500 IU/L. Пробите със стойности над този лимит трябва да се разреждат с равно количество солена разтвор и да се изследват повторно, а резултатите да се умножат по 2.

При пациенти с макроамилаземия може да се наблюдават подвеждащо повишаващи се стойности на амилазата и панкреатитната амилаза.

ИЗЧИСЛЕНИЯ

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times T.V. \times 1000}{M.M.A. \times S.V. \times L.P.} = \text{IU/L амилаза в пробата}$$

M.M.A. x S.V. x L.P.

Където:

ΔAbs/min = средна разлика в абсорбцията на минута

T.V. = общ реакционен обем (1.025ml)

1000 = конверсия на IU/ml в IU/L

M.M.A. = милимолярна абсорбтивност на p-Nitrophenol (8.5)

S.V. = обем на пробата (0.025ml)

L.P. = светлинен път (1cm)

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 1.025 \times 1000}{8.5 \times 0.025 \times 1.0} = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times 4824 = \text{IU/L амилаза}$$

Пример: Ако ΔAbs/min = 0.03, то 0.03 x 4824 = 144.7 IU/L

За да се конвертират резултатите в SI единици (nkat/L), умножете стойността в IU/L по 16.67

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

Проби със стойности над 1500 IU/L трябва да се разреждат с равно количество физиологичен разтвор и да се измерят отново. Умножете полученния резултат по 2.

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Серум: до 96 IU/L

Урина: 18 до 330 IU/L

Препоръчително е всяка лаборатория да установи свой обхват от очаквани стойности.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ТЕСТА

1. Линеиност: 1 500 IU/L.
2. Чувствителност: 5 IU/L при резолюция на апарата от 0.001
3. Сравнения: Изследване, сравняващо настоящия метод с подобен метод даде коефициент на корелация 0.999 и уравнение на регресията $y = 0.97x + 0.78$ за серум и коефициент на корелация 0.99 и уравнение на регресията $y = 0.96x + 1.99$ за урина.
4. Точност :

	В серия	Между серии		
Средна стойн.	60.6	414	57.2	409
Станд. откл.	2.4	8.9	1.1	6.2
S.V.(%)	4.0	2.1	2.0	1.5

RE:10/01

Производител: Teco Diagnostics, 1268 N. Lakeview Avenue, Anaheim, CA 92807 USA Tel. 714 693 7788 Fax: 714 693 3838

Вносител: "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1